

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

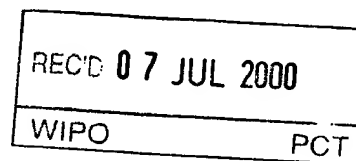
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

EP 00 / 2904



15. Juni 2000

09/937754



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 53 607.4

Anmeldetag: 08. November 1999

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Norbert H a m p p,
Amöneburg/DE

Bezeichnung: Linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurmbranen-Form

IPC: C 07 K 14/215

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 45563 0
TELEX 522 621

TELEFAX (089) 45563 999
E-MAIL email@weickmann.de

Unser Zeichen:
21520P DE/TIMDis

Anmelder:
Prof. Dr. Norbert Hampf
Schillerstraße 10

35287 Amöneburg-Roßdorf

Linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in
Purpormembranen-Form

Linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembranen-Form

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die linkerfreie kovalente Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form.

10 Bakteriorhodopsin (BR) ist ein Membranprotein, das z.B. in Halobakterien in der Form eines zweidimensionalen, scheibenförmigen, wasserunlöslichen Kristalls, der sogenannten Purpurmembran (PM) vorkommt. Die Purpurmembran hat eine Dicke von ca. 5 nm. Der Durchmesser der Purpurmembran liegt typischerweise im Bereich von 300 nm bis 1000 nm.

15 Die Purpurmembran besteht aus α -helikalen Bakteriorhodopsinmolekülen und ca. 10 Lipidmolekülen pro Bakteriorhodopsinmolekül. Das Bakteriorhodopsin ist in die aus den Lipidmolekülen gebildete Lipidmembran fast vollständig eingebettet. Daraus ergibt sich seine ungewöhnliche thermodynamische
20 Stabilität.

25 Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form wird als photochromes Material für optische Anwendungen technisch genutzt. Weiter ist Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form als Material mit photoelektrischen Eigenschaften von technischer Bedeutung.

Für diese technischen Anwendungen ist die kovalente Quervernetzung von Purpurmembranen untereinander vorteilhaft. Bei der Verwendung von Bakteriorhodopsin in der Photovoltaik werden pro Purpurmembranschicht
30 etwa 300 mV erhalten. Durch die Bildung von mehreren Purpurmembranschichten übereinander mittels kovalenter Quervernetzung können Elemente erhalten werden, die höhere Spannungen liefern. Ein weiterer interessanter

Aspekt ist die kovalente Kopplung von Purpurmembranen an Oberflächen, Polymere oder kleinere Moleküle, z.B. Farbstoffe.

5 Üblicherweise versucht man, für die kovalente Bindung von Purpurmembranen niedermolekulare Linkermoleküle, z.B. Glutaraldehyd, einzusetzen. Allerdings verlaufen diese Kopplungsreaktionen mit sehr schlechter Ausbeute. Der Grund dafür ist, dass nur wenige Aminosäuren von Bakteriorhodopsin außerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran liegen, sterisch gehindert sind und nur schwer mit den niedermolekularen Kopplungsreagenzien reagieren. 10 Niedermolekulare Kopplungsreagenzien haben aber noch einen weiteren gravierenden Nachteil. Sie können durch den Protonenkanal bis in das aktive Zentrum von Bakteriorhodopsin vordringen. Insbesondere eine Reaktion der Linkermoleküle mit der Bindungsstelle des Retinalaldehyds an Lysin-216 (Schiff-Base) führt zu einer irreversiblen Schädigung der 15 gewünschten Funktionen des Proteins. Deshalb sind die weit verbreiteten niedermolekularen Kopplungsreagenzien, die mit Aminogruppen reagieren, besonders nachteilig. Weiter müssen die niedermolekularen Linker im Überschuss zugegeben werden, um wenigstens eine einigermaßen akzeptable Ausbeute und Vernetzungsgeschwindigkeit zu erzielen. Eine Vielzahl 20 nicht reagierter Moleküle bleibt im Material und müsste nach der Reaktion entfernt werden. Dies ist z.B. bei der Herstellung von optischen Filmen nicht möglich.

Die Nachteile niedermolekularer Linker sind im Folgenden kurz stichpunktartig zusammengefasst: 25

- Wenige Aminosäuren von Bakteriorhodopsin sind für Linker zugänglich.
- Linker, die mit funktionellen Aminogruppen reagieren, dürfen nicht eingesetzt werden.
- 30 - Nicht abreagierte Linker müssen entfernt werden, da sonst eine unkontrollierte, zeitlich lang andauernde Nachreaktion

erfolgen wird, die zu einer stetigen Änderung der Materialeigenschaften und fehlender Langzeitstabilität führt.

5 Eine Aufgabe der Erfindung bestand somit darin, ein Verfahren zur kovalenten Verknüpfung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form, insbesondere zur direkten Quervernetzung von Purpurmembran ohne Verwendung von niedermolekularen Linkern bereitzustellen. Ein weiterer Einsatzbereich ist die Kopplung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form an Oberflächen, Polymere oder Hilfsstoffe, insbesondere Farbstoffe.

10 Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung von kovalent vernetztem Bakteriorhodopsin gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran-Form als Substrat einer Transglutaminase, insbesondere einer bakteriellen Transglutaminase
15 kovalent quervernetzt wird.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form ein Substrat der Transglutaminase und insbesondere der bakteriellen Transglutaminase (bTGA) ist. Dies ist insbesondere deshalb
20 unerwartet, da, wie oben ausgeführt, die Aminosäuren des Bakteriorhodopsins in der Purpurmembranform zum überwiegenden Teil innerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran liegen und somit nicht zugänglich sind. Das Bakteriorhodopsin liegt also in der Purpurmembran-Form nicht in freier Form, sondern als übergeordnete, scheibenförmige, Protein-Lipid-Kristallstruktur
25 vor. Trotzdem wird es überraschenderweise von bakterieller Transglutaminase als Substrat angenommen und umgesetzt.

Bisher war lediglich bekannt, dass lösliche Proteine, wie etwa Enzyme, an einen Träger, beispielsweise an Gelatine oder ein Markerenzym, Transglutaminase-katalysiert gekoppelt werden können. Solch ein Verfahren wird
30 z.B. in DE 197 32 917 C1 beschrieben. Dazu werden Proteinlösungen mit Transglutaminase umgesetzt. Einen Hinweis, dass wasserunlösliche Proteine

oder gar wasserunlösliche Protein-Lipid-Aggregate als Substrat von Transglutaminase angenommen werden, wird in DE 197 32 917 nicht offenbart. Noch viel weniger wird Bakteriorhodopsin oder gar Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form in Erwägung gezogen.

5

Ein ähnliches Verfahren zur Umsetzung von wasserlöslichen Proteinen mit TGA, beispielsweise die Quervernetzung von Kasein oder Gelatine, wird auch in US 5,731,183 und US 5,948,662 beschrieben. Dazu werden Lösungen der Proteine mit den in diesen US-Patenten offenbarten speziellen Transglutaminasen umgesetzt. Eine Offenbarung oder einen Hinweis darauf, dass auch wasserunlösliche Proteine oder gar übergeordnete Strukturen als Substrat für TGA dienen könnten, findet sich nicht. Noch viel weniger wird Bakteriorhodopsin oder gar Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form erwähnt.

10

15

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass man mit Hilfe von TGA Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran-Form direkt und ohne Hinzunahmenniedermolekularer Linkermoleküle untereinander quervernetzen kann. Weiterhin können an das Bakteriorhodopsin Polymere, Oberflächen oder Hilfsstoffe, z.B. Farbstoffe, gebunden werden. Die Quervernetzung findet bei etwa 40°C statt. Durch nachfolgende Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 80°C wird die TGA inaktiviert. Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form übersteht die Wärmebehandlung unbeschadet. So kann die Reaktion gezielt gestoppt werden. Eine Entfernung von überschüssigen niedermolekularen Linkern ist nicht notwendig.

20

25

Bakteriorhodopsin-Purpurmembranen, insbesondere unterschiedliche Varianten von Bakteriorhodopsin-Purpurmembranen, können sowohl als erstes wie auch als zweites Substrat für TGA, insbesondere bTGA fungieren. Dadurch ergeben sich umfangreiche Möglichkeiten zur direkten Vernetzung von Purpurmembranen untereinander oder/und zur kovalenten Kopplung von Polymeren, Oberflächen oder/und Substraten an Bakteriorhodopsin in

30

Purpurmembran-Form sowohl in quervernetzter als auch in nicht-vernetzter Form. Ein Aspekt der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur kovalenten Verbindung von Bakteriorhodopsin in Purpurmembranform an Polymere, Oberflächen oder/und Hilfsstoffe mittels TGA, wobei das Bakteriorhodopsin und das weitere Substrat mit einer Transglutaminase umgesetzt und miteinander kovalent verknüpft werden. Durch ein solches Verfahren können zum Beispiel kovalent verknüpfte Konjugate bestehend aus Bakteriorhodopsin in Purpurmembranform und einem weiteren Molekül gebildet werden. Geeignete Polymere an die Bakteriorhodopsin in Purpurmembran-Form mittels TGA kovalent gebunden werden kann, umfassen zum Beispiel Gelatine, Polyvinylalkohol und Polyethylen, die Seitengruppenmodifiziert sein können. Geeignete Substrate oder Hilfsstoffe sind insbesondere niedermolekulare Verbindungen, wie etwa Farbstoffe.

Da erfindungsgemäß auf jegliche Linkermoleküle verzichtet werden kann, ergeben sich erhebliche wirtschaftliche und technologische Vorteile.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die Figuren weiter erläutert, wobei Fig. 1 eine schematische Darstellung der Ergebnisse einer Zuckerdichte-Gradientenzentrifugation ist. Fig. 1A zeigt Bakteriorhodopsin-Wildtyp (BR-WT), Fig. 1B die Bakteriorhodopsin-Variante BR-D2N und Fig. 1C miteinander quervernetztes BR-WT und BR-D2N nach 24 Stunden Inkubation mit BTGase (bakterielle Transglutaminase).

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung von SDS-PAGE. A) BR-WT; B) BR-WT + BTGase, 0 Stunden inkubiert bei 37°C; C) BR-WT + BTGase, 10 Minuten inkubiert bei 37°C; D) BR-WT + BTGase, 20 Minuten inkubiert bei 37°C; E) BR-WT + BTGase, 120 Minuten inkubiert bei 37°C.

Fig. 3 zeigt die Ausbildung von Vernetzungsprodukten von BR-WT und BR-D2N in Gegenwart von bakterieller Transglutaminase in Abhängigkeit der Zeit.

Beispiele:

Beispiel 1)

5 ml einer 42,5%- und 37,5%-Zuckerlösung werden verwendet, um mit einem herkömmlichen Gradientenmischer einen linearen Zuckergradienten zu erzeugen. Dieser Gradient dient zur Analyse von vernetztem und unvernetztem Bakteriorhodopsin.

Beispiel 2)

Eine Bakteriorhodopsin-Wildtype-(WT)-Lösung (20 mg/ml) und eine Lösung der Bakteriorhodopsin-Variante BR-DZN (20 mg/ml) werden mit Puffer (pH 7,0, 100 mM, Phosphatpuffer) und BTGase-(9,3 U/ml)-Lösung gemischt, so dass die BTGase im Vergleich zu Bakteriorhodopsin im vierfachen Überschuss vorliegt. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 40°C. In der Reaktionsmischung liegt dann praktisch nur noch quervernetztes Bakteriorhodopsin vor (Abb. 1c).

Beispiel 3)

Reaktionsansatz wie bei 2). Die Reaktion wird allerdings zu einem beliebigen Zeitpunkt durch kurzfristiges Erwärmen auf 80°C gestoppt. In der Reaktionsmischung liegt dann quervernetztes und nicht quervernetztes Bakteriorhodopsin vor. Durch die Wahl des Stoppzeitpunktes können beliebige Verhältnisse zwischen vernetztem und unvernetztem Bakteriorhodopsin eingestellt werden (Abb. 2 und 3). Je höher der Vernetzungsgrad ist, desto starrer wird das quervernetzte Bakteriorhodopsin.

Die rote Bande in Abb. 3 stellt BR-WT dar, die blaue Bande BR-D2N. Durch Quervernetzung wird das lilafarbige Vernetzungsprodukt $BR-WT_x-BR-D2N_y$ erhalten.

Beispiel 4)

Eine Gelatinelösung (Schweineschwartengelatine), 10% (w/v) wird mit dem gleichen Volumen einer BR-Lösung (PM-Konzentration 39,1 mg/ml) und mit BTGase Lösung (12 U/ml) versetzt, so dass die Menge der BTGase mit der Menge des BR's vergleichbar ist. Die Reaktionslösung wird dann bei 37°C über Nacht inkubiert. In der Reaktionsmischung liegt das BR dann in Gelatine gebunden vor.

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von kovalent vernetztem Bakteriorhodopsin,
dadurch gekennzeichnet, dass Bakteriorhodopsin in der Purpormembran-Form als Substrat einer Transglutaminase umgesetzt und dabei kovalent quervernetzt wird.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche Bakteriorhodopsin-Varianten miteinander vernetzt werden.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass Quervernetzungsreaktion durch kurzfristiges Erwärmen auf 80°C oder darüber gestoppt wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass eine bakterielle Transglutaminase verwendet wird.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass eine Transglutaminase verwendet wird, die ohne Cofaktor aktiv ist.
- 30 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass das Bakteriorhodopsin mit einem Polymeren, einer Oberfläche oder/und einem Hilfsstoff quervernetzt wird.

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur linkerfreien kovalenten Kopplung von Bakterio-
5 rhodopsin in Purpurmembran-Form beschrieben.

is 04.11.1999

1/2

Lineare Zuckergradienten

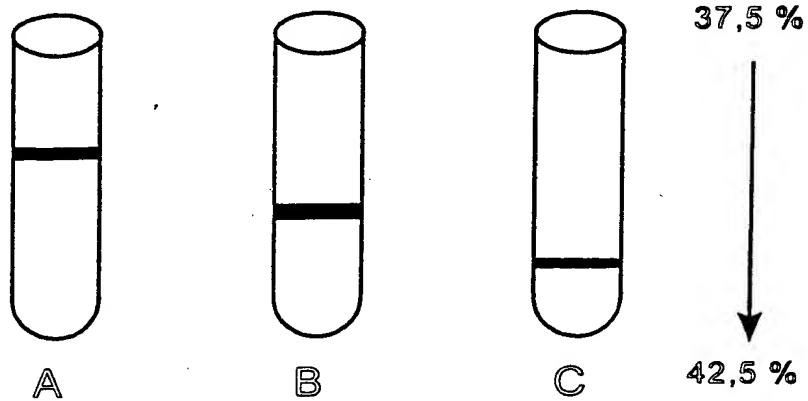


Abb. 1. Schematische Darstellung der Ergebnisse der Zuckerdichtegradientenzentrifugation: A) BR-WT; B) BR-D2N; C) BR-WT + BR-D2N nach 24h Inkubation mit BTGase

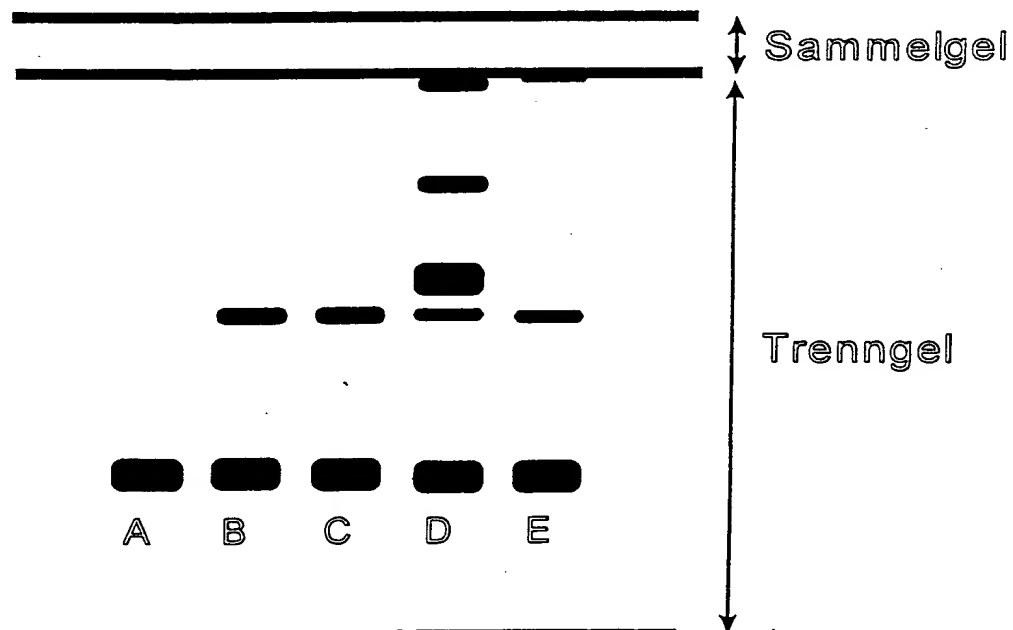


Abb. 2. Schematische Darstellung der SDS-PAGE. A) BR-WT; B) BR-WT+BTGase, 0 h inkubiert bei 37°C; C) BR-WT+BTGase, 10 Min. Inkubiert bei 37°C; D) BR-WT +BTGase 20 Minuten inkubiert bei 37°C; E) BR-WT + BTGase 120 Minuten inkubiert bei 37°C

